Digestive Ferments Co. — Detroit Michigan U. S. A.

ANTIGENO BACTO-KAHN

Controllato personalmente dal Dr. Kahn nei Laboratori "*Difco*"

Memoria del Dr. FIORENTINO sulla Reazione di Kahn

Prezzo L. 5.—

DIAGNOSTICA
E
TECNICA DI LABORATORIO
RIVISTA MENSILE

VOL. I 25 APRILE 1930 - VIII N. 4

RASSEGNA

LA REAZIONE DI KAHN

DOTT. MARIO FIORENTINO

Capo di Laboratorio presso il 2° Istituto di Patologia Medica della R. Università di Napoli

Fra le molte reazioni colloidali proposte fino ad oggi per la siero-diagnosi della lue, quella che più di ogni altra si è affermata nella pratica è la reazione di KAHN. Ciò è dovuto, oltre che alla grande semplicità della tecnica di questa reazione, alla bontà e alla costanza dei risultati che con essa si ottengono.

Ormai oltre mezzo milione di prove sono state eseguite con questo metodo e i risultati sono stati sempre così sodisfacenti che in qualche Stato d'America si tende ad abbandonare la reazione di WASSERMANN per la nuova reazione. Essa è, tuttavia, ancora insufficientemente conosciuta presso di noi; ma sopra tutto è mal nota la vasta opera svolta da R. L. KAHN dal 1921 ad oggi ed è grave danno, poichè questo Autore ha compiuto uno studio sistematico straordinariamente accurato sopra tutte le modalità che regolano la precipitazione specifica degli estratti lipidici di organi animali in contatto con sieri luetici.

Dobbiamo appunto a R. L. KAHN se molte questioni di indole generale, lasciate nell'ombra dalla scarsezza degli studi precedenti, siano state chiarite. Per molto tempo, infatti, si è pensato che il fenomeno della precipitazione determinata dai sieri luetici nei vari estratti a ciò usati non avesse nulla di sostanzialmente diverso dal fenomeno immunitario della precipitazione fra sieri ed antigeni specifici, scoperto nel 1897 da R. KRAUS.

Il primo a descrivere una siero-precipitazione diagnostica per la lue fu il MICHAELIS, il quale mescolava il siero di sifilitici con un estratto acquoso di fegato eredo-luetico, cioè con l'estratto preferito per la R. di WASSERMANN in quel tempo (1907). Più tardi, dopo cioè che LANDSTEINER ebbe mostrato la possibilità di usare per la R. di WASSERMANN un estratto alcoolico di fegato eredo-luetico, JACOBSTAHL annunziò un metodo sierodiagnostico per la lue basato sulla precipitazione di un estratto alcoolico. Questo stesso Autore dimostrò per primo la differenza sostanziale esistente fra il precipitato che si ottiene nelle reazioni immunitarie fra antigeni e anticorpi corrispondenti e il precipitato che si ottiene nelle reazioni colloidali usate per la sierodiagnosi della lue: il primo è costituito quasi esclusivamente da globuline, il secondo invece quasi esclusivamente da lipidi. I risultati degli studi di JACOBSTAHL (1911) sono stati in seguito confermati da PAUL & EPSTEIN e da altri.

Nel 1921 R. L. KAHN iniziò le sue notevoli esperienze sul fenomeno della precipitazione determinata dai sieri luetici negli estratti organici usati per le varie reazioni diagnostiche.

Fra i primi risultati delle esperienze di KAHN fu l'osservazione di un fatto importantissimo per lo sviluppo ulteriore delle reazioni sierodiagnostiche, cioè che la rapidità della flocculazione viene diminuita dall'aggiunta di liquido indifferente, come la soluzione clorosodica comunemente impiegata quale veicolo presso a poco inattivo (così detta soluzione *fisiologica*). Tale azione rallentatrice può arrivare fino alla inibizione completa del fenomeno.

KAHN cercò, naturalmente, di aumentare al massimo la concentrazione dei singoli reagenti, ma ben presto si avvide che, mentre fino ad un certo punto la rapidità della precipitazione cresce di pari passo con la concentrazione, ove questa sorpassi un limite determinato si avvera il fenomeno opposto, cioè la rapidità della precipitazione comincia gradualmente a decrescere.

Questo comportamento si palesò ben presto di indole generale,

cioè inerente alla intima natura dei fenomeni su cui tutte le sieroreazioni flocculanti sono basate. Fu constatato, infatti, che anche per la concentrazione dei lipidi, i quali sono certamente le sostanze cui è legata l'attività speciale dei vari estratti usati, vige la stessa regola: vi è un *optimum* caratteristico, al disotto e al disopra del quale vi sono condizioni sfavorevoli alla produzione dei fenomeni che qui interessano. Tale comportamento *zonale* si riscontra in tutte le reazioni che si svolgono fra colloidi, onde molti credono di vedere avvalorata l'ipotesi che nella sierodiagnosi della lue si abbia da fare con fenomeni colloidali.

A parte ogni considerazione di carattere dottrinale, esponiamo i fatti messi in luce dalle esperienze di KAHN e della sua scuola.

Innanzi tutto, si è notato che gli estratti, benchè preparati secondo uno stesso metodo, non risultano sempre perfettamente simili fra loro. Ciò ha fatto pensare che fra gli organi dei vari animali utilizzati esistano differenze, probabilmente dovute alla varia età degli animali stessi, al loro stato di salute, all'alimentazione da essi seguita, ecc. Ogni *antigene* ha, perciò, una propria curva di reattività. È forse il principale merito di KAHN l'aver dimostrato come si possano correggere le differenze esistenti fra estratti preparati con organi provenienti da animali diversi, così da ricondurre ogni estratto a uno stesso grado di reattività e assicurare, per conseguenza, una grande costanza di risultati.

Occorre conoscere le interessanti relazioni quantitative esistenti fra antigeni e soluzione salina. Se a quantità eguali di uno stesso antigene si aggiungono quantità scalari di soluzione salina si notano dei fenomeni a carattere zonale che noi indicheremo schematicamente in forma di tabella, prendendo ad esempio un determinato antigene e ricordando ancora una volta che vi possono essere differenze quantitative fra i singoli antigeni, pur restando invariato il comportamento generale di essi.

Si distinguono subito tre *zone*, definite da KAHN: zona di *solubilità*; zona di *aggregazione*; zona di *opalescenza*.

Aggiungendo ancora, dopo un certo tempo, alle miscele di antigene e soluzione salina, un eccesso di soluzione salina o di siero ematico di persona non sifilitica si notano due altre *zone*: una zona di aggregazione secondaria e una zona di opalescenza secondaria. Si vede, cioè, che mentre in alcune miscele (generalmente quelle in cui il rapporto fra antigene e soluzione salina non è inferiore a 1 : 1) gli aggregati lipidici, presenti in forma di granuli o fiocchetti, sono stabili, cioè non si ridisciolgono per l'ulteriore aggiunta di soluzione salina o di siero non luetico, ma anzi si fanno ancora più evidenti; nelle altre miscele (quelle

in cui il rapporto fra antigene e soluzione salina è disceso al disotto di una certa misura, che, come abbiamo detto, si aggira ordinariamente intorno a 1 : 1) gli aggregati lipidici sono instabili, cioè si ridisciolgono prontamente per aggiunta di soluzione salina o di siero non luetico.

Questo diverso comportamento mostra l' esistenza di una *zona critica* nella serie dei rapporti quantitativi fra antigeni e soluzione salina, zona nella quale gli aggregati lipidici che si formano per la mescolanza

TABELLA I

Antigene preparato secondo il metodo di KAHN	Soluzione acquosa di Na Cl al 0,9 $^{\circ}/_{0}$ aggiunta all'antigene	Fenomeni osservati nella miscela	Zone
cc. 1	cc. 0,01-0,04	Nulla. Liquido trasparente.	I - Solubilità
cc. 1	cc. 0,05-0,09	Nel liquido limpido si vedono separarsi piccoli e rari cristalli di colesterol.	II Aggregazione
cc. 1	cc. 0,10-0,20	Il liquido comincia ad opacarsi leggermente. Si separano cristalli di colesterol e piccoli aggregati lipidici amorfi.	
cc. 1	cc. 0,25-1,50	Il liquido s' intorbida sempre più. Non sono più distinguibili cristalli di colesterol : il precipitato è costituito da aggregati lipidici complessi, sempre più grossi.	
cc. 1	cc. 1,50-2,50 (ed oltre)	Il liquido s'intorbida sempre meno. I granuli lipidici si fanno sempre più piccoli, fino a diventare invisibili, rendendo il liquido trasparente, benchè opalino.	III Opalescenza

dell' antigene con la soluzione salina passano da uno stato di *non dispersibilità* ad uno stato di dispersibilità. KAHN definisce *titolo* di un antigene la quantità minima di soluzione clorosodica al 0,9 $^{\circ}/_{0}$ che aggiunta a 1 cc. dell'antigene determina la formazione di aggregati lipidici

suscettibili di pronta e completa dispersione per aggiunta ulteriore di soluzione salina o di siero non luetico (*).

Ogni antigene mostra la massima sensibilità specifica (rispetto ai sieri luetici) quando è diluito secondo il titolo, evidentemente per il particolare stato di aggregazione delle particelle lipidiche sospese in seno al liquido. È interessante notare, a questo proposito, che la reattività specifica delle sospensioni di antigene è dovuta *esclusivamente* a tali particelle lipidiche; infatti, se queste si raccolgono isolatamente mediante la centrifugazione e si sospendono in una semplice soluzione salina idroalcoolica, analoga a quella di cui risulta costituito il veicolo delle sospensioni originali, e si cimenta la nuova sospensione così ottenuta con vari sieri luetici e non luetici, si ottengono risultati in tutto simili a quelli forniti dalle sospensioni originali.

Anche fra sospensione di antigene e sieri luetici esistono relazioni quantitative ben definite; anche qui vi è una zona che circoscrive il fenomeno della flocculazione specifica utilizzabile per la siero diagnosi. L'ampiezza di questa zona è proporzionale alla intensità con cui reagiscono i sieri luetici: i sieri che reagiscono più intensamente provocano la flocculazione dell'antigene anche se adoperati in dosi così piccole da risultare insufficienti per sieri meno intensamente reattivi.

È da notare che mentre la dose minima di siero sufficiente per provocare la flocculazione varia, come si è detto, da un siero all'altro (dal rapporto di 1 : 1 al rapporto di 12 : 1 rispetto alla sospensione di antigene), la dose massima attiva è presso a poco comune a tutti i sieri luetici (circa 100 : 1 rispetto alla sospensione di antigene). KAHN spiega questo fatto ammettendo che, allorquando la diluizione subita dall'antigene per effetto dell'aggiunta di siero luetico va oltre un certo punto, i granuli colloidali che si formano sono così piccoli da non essere più visibili.

È fondamentale, comunque, il fatto che il siero di persone non luetiche non provoca flocculazione dell'antigene, qualunque sia la proporzione nella quale vi venga aggiunto. Ciò induce a supporre che la differenza fra sieri luetici e non luetici sia, per ciò che qui interessa, una differenza di natura qualitativa e non già, come alcuni autori sostengono, puramente quantitativa.

(*) Ogni volta che si parla qui di dispersione completa non s'intende questa espressione nel senso rigoroso della fisica chimica (cioè dispersione molecolare), ma si vuol dire solo: scomparsa di ogni particella isolata visibile a occhio nudo o a piccolo ingrandimento.

KAHN ha studiato sperimentalmente l' influenza esercitata da una gran quantità di fattori sopra l'esito della sua reazione, traendo dai suoi studi molte conclusioni sia dottrinarie che pratiche. Egli notò che l'aumento della concentrazione salina nella soluzione clorosodica usata tende, sempre entro certi limiti, ad aumentare la stabilità degli aggregati lipidici, i quali divengono indispersibili se la concentrazione del sale ecceda il 4 per cento.

Altro fatto osservato da KAHN e da lui utilizzato nella sua reazione è che lo scuotimento della mescolanza antigene più siero luetico agevola molto la formazione del precipitato caratteristico. I sieri più intensamente reattivi (fortemente *positivi*) inducono flocculazione dopo pochi secondi; quelli più *deboli* provocano il massimo di precipitazione dopo qualche minuto primo (raramente dopo più di 3'). La frequenza delle oscillazioni non è priva d' importanza: l' *optimum* è fra 275 e 285 oscillazioni per minuto primo con scarti di 4 cm.; al di là di 350 si nota una diminuzione della grandezza degli aggregati lipidici, per cui la lettura dei risultati diviene più difficile.

L'influenza della temperatura è stata anche oggetto di esperienze comparative da parte di KAHN: egli ha notato che, quando la sua reazione si svolge in un ambiente la cui temperatura si abbassa al disotto dei 20° C., la grandezza degli aggregati lipidici tende talvolta a diminuire alquanto. Circa il riscaldamento dei sieri prima della prova, quale viene usato per la così detta *inattivazione* nei metodi basati sullo studio della fissazione del complemento, KAHN osservò che esso agevola notevolmente la formazione del precipitato da parte di sieri luetici. Tale azione coadiuvante del calore è, entro certi limiti, proporzionale alla temperatura, così che, per esempio, un riscaldamento di 10' a 60° C. produce gli stessi effetti che un riscaldamento di 30' a 56° C. I sieri non riscaldati forniscono circa la metà delle reazioni positive rispetto ai sieri riscaldati. Il riscaldamento deve essere praticato subito prima di eseguire la reazione. Ove mai siano già trascorse parecchie ore (più di 5) bisogna riportare i sieri a 56° C. per 10'-15'.

Sono utilizzabili per la reazione i sieri leggermente intorbidati in seguito a spontanea separazione di lipidi (col riscaldamento si chiarificano); i sieri chilosi; i sieri itterici; i sieri laccati; i sieri che mostrano potere anticomplementare; i sieri conservati da lungo tempo (purchè non inquinati da microbi).

Usando la precipitazione frazionata con solfato di ammonio a varie concentrazioni, KAHN ha potuto dimostrare che tanto nel siero di sangue

quanto nel liquido cefalo-rachidiano dei luetici le ignote sostanze capaci di reagire con gli antigeni sono legate esclusivamente alle globuline.

Le piccole quantità di acidi o di alcali non influiscono notevolmente sui risultati, a causa del forte potere tamponante del siero; le quantità bene apprezzabili di acidi (cioè a partire da una concentrazione equivalente presso a poco alla soluzione 0,03 *n* di HCl) tendono a produrre flocculazione anche in presenza di sieri di individui sicuramente indenni da lue; le quantità un po' forti di alcali (equivalenti all'incirca a soluzione 0,025 *n* di NaOH) tendono, invece, a produrre reazioni negative anche con sieri luetici.

Bisogna scrupolosamente evitare l'uso dei tappi di gomma; vanno adoperati tappi di sughero ben protetti da un involucro di stagnola di buona qualità, poichè si è visto che tanto la gomma quanto il sughero cedono facilmente all'alcool, del quale in gran parte è costituito l'antigene, sostanze che flocculano quando questo venga diluito (esperienze confermate da WYLER del *British Ministry of Health*). È quasi superfluo far notare che bisogna impedire l'evaporazione, sia pure assai lenta, dell'alcool dagli estratti.

Sono interessantissime le esperienze eseguite da KAHN con parecchie centinaia di sieri provenienti sia da luetici che da persone indenni da lue (1864 sieri), per assodare se nell'azione reciproca fra la sospensione lipidica dell'antigene e i sieri luetici si determinasse fissazione di complemento. Egli seguì questa tecnica: subito dopo aver letto i risultati della sua reazione (cioè circa 3' dopo avvenuta la mescolanza dei sieri con la sospensione di antigene) prelevava dal tubo contenente la minore dose di antigene cc. 0,15 della miscela (corrispondente a circa cc. 0,035 di siero); aggiungeva cc. 0,1 di una diluizione di siero fresco di cavia preparata in modo che in quel volume ne fosse contenuto il doppio della quantità necessaria a provocare l'emolisi nei controlli (cioè due *unità* complementari); metteva in bagno-maria a 37° C. per 30'; aggiungeva cc. 0,1 di una diluizione di siero emolitico antimontone tale da contenere 2 unità emolitiche e cc. 0,1 di sospensione al 5 $^{\circ}/_{0}$ di emazie di montone in soluzione fisiologica; rimetteva in bagno-maria e dopo 10' leggeva i risultati. Nel 93 $^{\circ}/_{0}$ dei casi vi fu piena concordanza fra la R. di KAHN e la reazione di fissazione del complemento; nel 5 $^{\circ}/_{0}$ vi fu concordanza parziale (cioè vi furono sieri che dettero risultato nettamente positivo o negativo con uno dei due metodi e dubbio con l'altro); nel 2 $^{\circ}/_{0}$ dei casi vi fu discordanza completa di risultati. Va notato il fatto che i sieri i quali

reagivano intensamente con uno dei due metodi, reagivano intensamente anche con l'altro, mentre i sieri *deboli* si manifestavano tali con entrambi i metodi.

Da queste esperienze KAHN deduce (analogamente a quanto pensano anche SACHS, DEAN e parecchi altri) che la flocculazione e la fissazione del complemento siano due fenomeni legati alla reazione fra le stesse sostanze dei sieri luetici e degli *antigeni*, anche se in pratica non sia sempre possibile svelare ambedue i fenomeni servendosi delle stesse condizioni sperimentali.

KAHN ha mostrato che tutti gli estratti alcoolici di cuore, comunque preparati, sono suscettibili di flocculazione in contatto con sieri luetici, purchè si trovino per ciascun estratto le condizioni adatte, variabili da caso a caso (diluizione dei reagenti, riscaldamento, durata del contatto, ecc.), ma parecchi estratti forniscono con tanta difficoltà il fenomeno della precipitazione da non essere utilizzabili nella pratica sierodiagnostica.

Non è stato possibile fino ad oggi individuare le sostanze cui è legata l'attività specifica degli estratti di organi. Certo, nè il colesterol, nè la lecitina, nè i grassi neutri, nè gli acidi grassi, nè i saponi possiedono da soli le proprietà che mostrano gli estratti di cuore. Il giorno in cui si riuscisse a conoscere la sostanza (o le sostanze) cui è legata l'azione dei cosí detti antigeni si farebbe un gran passo, perchè si potrebbe fra l'altro evitare l'azione di altre sostanze organiche, le quali passano fatalmente anch'esse nei solventi usati per preparare gli estratti e fra le quali pare vi siano sostanze ad azione disturbatrice.

KAHN si serve di cuori bovini i quali sono stati seccati e ridotti in polvere dopo essere stati liberati dall'adipe.

Egli ha avuto risultati meno buoni adoperando organi freschi, ciò che spiega in parte con la diluizione subita dai liquidi estrattori per l'acqua abbondantemente contenuta nei tessuti ed in parte col fatto che le polveri rappresentano la mescolanza di molti cuori, così che sono compensate le differenze individuali non infrequenti fra i singoli animali da macello.

Prove comparative fra estratti alcoolici ottenuti trattando direttamente la polvere di cuore o polvere precedentemente trattata con etere (secondo NEUMANN & GAGER) oppure polvere già trattata con acetone (secondo NOGUCHI) hanno mostrato la superiorità degli estratti ottenuti con il secondo dei metodi citati. Dopo numerosi esperimenti, KAHN si è fermato sulle seguenti modalità di estrazione: si pongono in un matraccio

da 250 cc. di capacità, 25 gr. di polvere di cuore bovino e vi si aggiungono 100 cc. di etere etilico purissimo; si mescola e si lascia agire per 10' agitando spesso, si allontana l'etere e si ripete analogamente l'estrazione altre tre volte, adoperando ogni volta 75 cc. di etere e prolungando esattamente per 10' ogni estrazione; dopo aver allontanato l'ultima porzione di etere si prosciuga la polvere e vi si aggiunge alcool etilico puro concentrato (*almeno* 95°) nella proporzione di 5 cc. per ogni grammo di polvere; si mescola, si agita per 10' e si lascia riposare a temperatura ambiente (circa 21° C.) durante 3 giorni; trascorso tale termine si agita per 5' e si filtra; si conserva all'oscuro a temperatura ambiente, in recipienti ben chiusi con tappi di sughero (non di gomma!) accuratamente rivestiti da un foglio di stagnola fine. Questo estratto alcoolico non è ancora l'antigene completo: occorre disciogliervi a caldo gr. 0,6 di colesterol purissimo per ogni 100 cc.; filtrarlo e titolarlo per l'uso; tuttavia una parte (circa $^1/_5$) va conservata senz'altra aggiunta o manipolazione, perchè, come si vedrà fra breve, può servire per correggere l'antigene stesso.

Variando il numero e le modalità delle estrazioni eteree, varia il contenuto lipidico e con esso la qualità e l'attività degli antigeni. Di ciò si può trarre partito nel modo che sarà detto fra breve.

Si è visto, inoltre, che il grado di autodigestione subita dal cuore al momento di seccarlo o di prepararne l'estratto influisce sulla bontà di questo. Contrariamente a quanto si potrebbe supporre, un cuore freschissimo fornisce estratti assai meno attivi di un cuore che sia stato conservato piuttosto a lungo; oltre un certo tempo, però, si producono alterazioni che nuocciono alla bontà degli estratti (questi forniscono sospensioni non ben dispersibili). È degno di nota che anche la polvere di cuore dopo parecchi mesi di conservazione a temperatura ambiente può alterarsi, ragion per cui è necessario conservarla in ghiacciaia. Molte di queste alterazioni possono essere compensate aumentando il numero delle estrazioni eteree, così come, volendo usare cuori raccolti di fresco al macello (specialmente cuori di montone o di maiale), è necessario per lo più ridurre il numero delle estrazioni.

Oggi si trovano in commercio estratti forniti di attività ben determinata e costante, praticamente simili ad un campione (*standard*) fissato da KAHN dopo una serie di prove condotte in collaborazione con UDO J. WILE e H. L. KEIM (del Dipartimento di dermatologia e sifilologia dell'Università di Michigann, a Ann Arbor, negli Stati Uniti d'America). Questi antori hanno studiato esattamente in che modo si possa ri-

condurre ogni antigene ad un grado *standard* di attività, giungendo a cognizioni assai interessanti anche dal punto di vista pratico. Hanno visto, per esempio, che il grado di attività di un antigene è in rapporto così stretto col *titolo*, che allorquando due antigeni hanno lo stesso titolo o vi sono ricondotti con i mezzi di cui si dirà in seguito posseggono o acquistano un grado di attività quasi sempre molto vicino.

L'antigene assunto da KAHN e collaboratori come *campione* ha un titolo di 1,1. Esso accoppia un alto grado di sensibilità con una specificità quasi assoluta. Oltre a questo antigene gli autori ne hanno preparato un altro, notevolmente più sensibile, ma, a quanto pare, non così rigorosamente specifico e lo hanno definito « antigene sensibilizzato ». Anche per questo antigene è stato stabilito un grado di attività ben determinato. Si possono preparare antigeni di sensibilità ancora maggiore, ma finora non si posseggono studi sufficienti intorno ad essi dal punto di vista di una larga applicazione pratica, onde gli autori consigliano di definire genericamente tali preparati con la designazione di « antigeni sperimentali ».

Secondo KAHN gli antigeni di sensibilità superiore al campione possono essere utilizzati nei casi in cui si voglia seguire le fasi di una infezione già accertata per altre vie (luetici in corso di cure), oppure si voglia chiarire il significato di sieroreazioni « dubbie » ottenute con antigene *standard*. Si comprende che i risultati negativi ottenuti con antigeni « sensibilizzati » o « sperimentali » hanno maggior valore di quelli che si hanno con preparati meno sensibili. Per ottenere antigeni di alta sensibilità KAHN riduce la quantità di etere con cui si compiono le quattro estrazioni descritte della polvere di cuore, rispettivamente a cc. 50; 50; 40; 40; o, meglio ancora, arricchisce di lipidi un antigene *standard*, aggiungendoveli sotto forma di una speciale soluzione concentrata, ch'egli chiama *reattivo sensibilizzante*.

La preparazione del reattivo è semplice: si evapora una certa quantità di etere con cui si sono compiute le già descritte estrazioni delle polveri di cuore; si raccoglie il residuo; si prosciuga; si scioglie in alcool assoluto, nella proporzione di 1 grammo per ogni 10 cc. di alcool; si agita per 10'; si lascia per 3^h in ghiacciaia (alla temperatura di circa 6°C.); si filtra; si pone in termostato (a 37°C.) in bocce ben chiuse e vi si lascia per 24^h; si aggiunge colesterol purissimo, nella proporzione di gr. 0,6 per ogni 100 cc.

Questo « reattivo sensibilizzante » (che si conserva presso che inalterato per lungo tempo a temperatura ambiente) può essere aggiunto

all'antigene *standard* in proporzioni variabili dall'1 al 6 °/₀. Al disotto dell'1 °/₀ non apporta alcuna modifica apprezzabile alla sensibilità dell'antigene; al disopra del 6 °/₀ comincia a produrre una graduale diminuzione della sensibilità. Anche qui, dunque, si nota un fenomeno zonale, rappresentabile graficamente con una curva parabolica, il cui apice corrisponde ad un certo *optimum* della concentrazione lipidica.

Un altro fatto singolare è stato osservato da KAHN: se ad un antigene si aggiunge una quantità di « reattivo sensibilizzante » così piccola da non influire notevolmente sulla sensibilità dell' antigene stesso e poi si diluisce alquanto l'antigene (con alcool colesterolato al 0,6 °/₀) la sensibilità di esso si eleva in modo spiccato. (Una diluizione eccessiva provoca, com'è naturale, abbassamento della sensibilità). KAHN crede di poter ammettere, in base ai fenomeni notati, che in ogni estratto vi siano due diverse frazioni lipidiche, una delle quali abbia potere inibente sull'altra e divenga più attiva quando la concentrazione totale aumenti al di là di un certo limite.

Lasciando impregiudicato ogni tentativo più o meno ingegnoso di spiegare i vari fatti osservati, vediamo in qual maniera si può profittare praticamente della conoscenza di essi per ricondurre qualunque antigene al grado voluto di sensibilità.

La prima cosa da fare quando si vuol controllare un antigene è quella di stabilirne il titolo, poichè è noto che ogni antigene ha l'ottimo della sua attività appunto quando è diluito secondo il proprio titolo; inoltre, poichè il titolo è in certo modo in rapporto con il contenuto di lipidi e questi condizionano l' attività degli antigeni, la conoscenza del titolo consente già da sola di arguire, almeno con molta verosimiglianza, la ricchezza di lipidi e quindi la probabile ragione (eccesso o difetto di concentrazione) per cui un antigene si discosta dal grado di sensibilità desiderato e, per conseguenza, la via da seguire per la correzione.

Il titolo si misura nel modo seguente: in una serie di provette si pongono quantità scalari di soluzione di NaCl al 0,9 °/₀ (per esempio cc. 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4); si aggiunge in ogni tubo la stessa quantità di antigene (per esempio cc. 1), badando che la mescolanza tra la soluzione salina e l'antigene avvenga di colpo; si lascia riposare per 30'; da ciascuna provetta si prelevano (con pipette graduate al millesimo di cc.) tre porzioni, rispettivamente di cc. 0,05; 0,025; 0,0125, che si portano in altrettanti piccoli tubi da saggio; si aggiungono in ciascuno di questi cc. 0,15 di soluzione clorosodica al

0,9 $^{0}/_{0}$; si agitano energicamente i tubi per 3′ con una frequenza di 275 a 285 oscillazioni per minuto primo (da 4 a 5 per secondo); si aggiunge cc. 1 di soluzione clorosodica in ciascuno dei tubi contenenti cc. 0,05 di antigene e cc. 0,5 in ciascuno degli altri tubi ; si osserva il contenuto dei tubi, guardando con illuminazione tangenziale su fondo scuro. Come si è detto, il titolo è rappresentato dalla minima quantità di soluzione clorosodica al 0,9 $^{0}/_{0}$ che aggiunta a 1 cc. di antigene fornisce sospensioni le quali si chiarificano completamente quando, dopo 30′, si compie una seconda aggiunta di soluzione salina e restano limpide anche dopo scuotimento. (S'intende che occorre badare complessivamente ai tre tubi con le tre diverse dosi della sospensione di antigene ; poichè se anche uno solo dei tre fosse torbido bisognerebbe concludere che la sospensione non era secondo il titolo).

Lo scuotimento dei tubi può esser fatto a mano quando questi siano in piccolo numero (naturalmente bisogna disporre di portaprovette adatti e della necessaria esperienza) ; ma quando il numero dei tubi sia alquanto considerevole occorre far uso di uno degli appositi agitatori, che si trovano in commercio e del quale si vede un esemplare nella fig. 1.

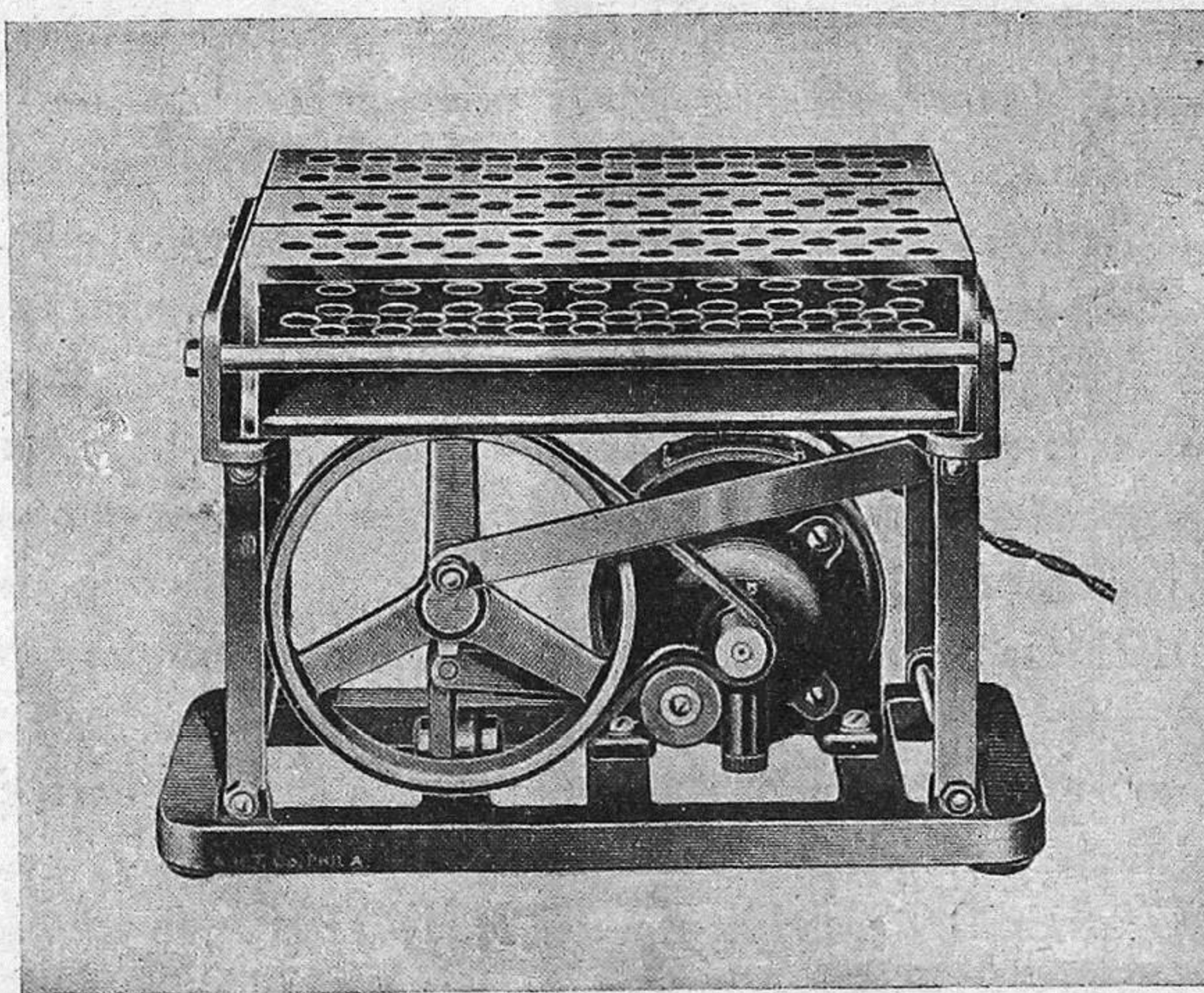



Fig. 1

(dall'opera di *R. L. Kahn*: The Kahn test)

La lettura dei risultati richiede anch' essa un po' di esperienza. Dopo qualche prova ognuno trova le condizioni più favorevoli : KAHN

consiglia di guardare i tubi tenendoli inclinati innanzi ad uno specchio concavo (p. es. quello del microscopio); qualche altro preferirà guardare con una lente convergente (ottimo, secondo la personale esperienza di chi scrive, il tipo da orologiaio); qualche altro ancora preferirà guardare ad occhio nudo, facendo muovere lentamente il liquido sulle pareti dei tubi, tenuti in posizione quasi orizzontale parecchio al disopra della testa, dirigendo lo sguardo sopra un fondo nero (fig. 2).

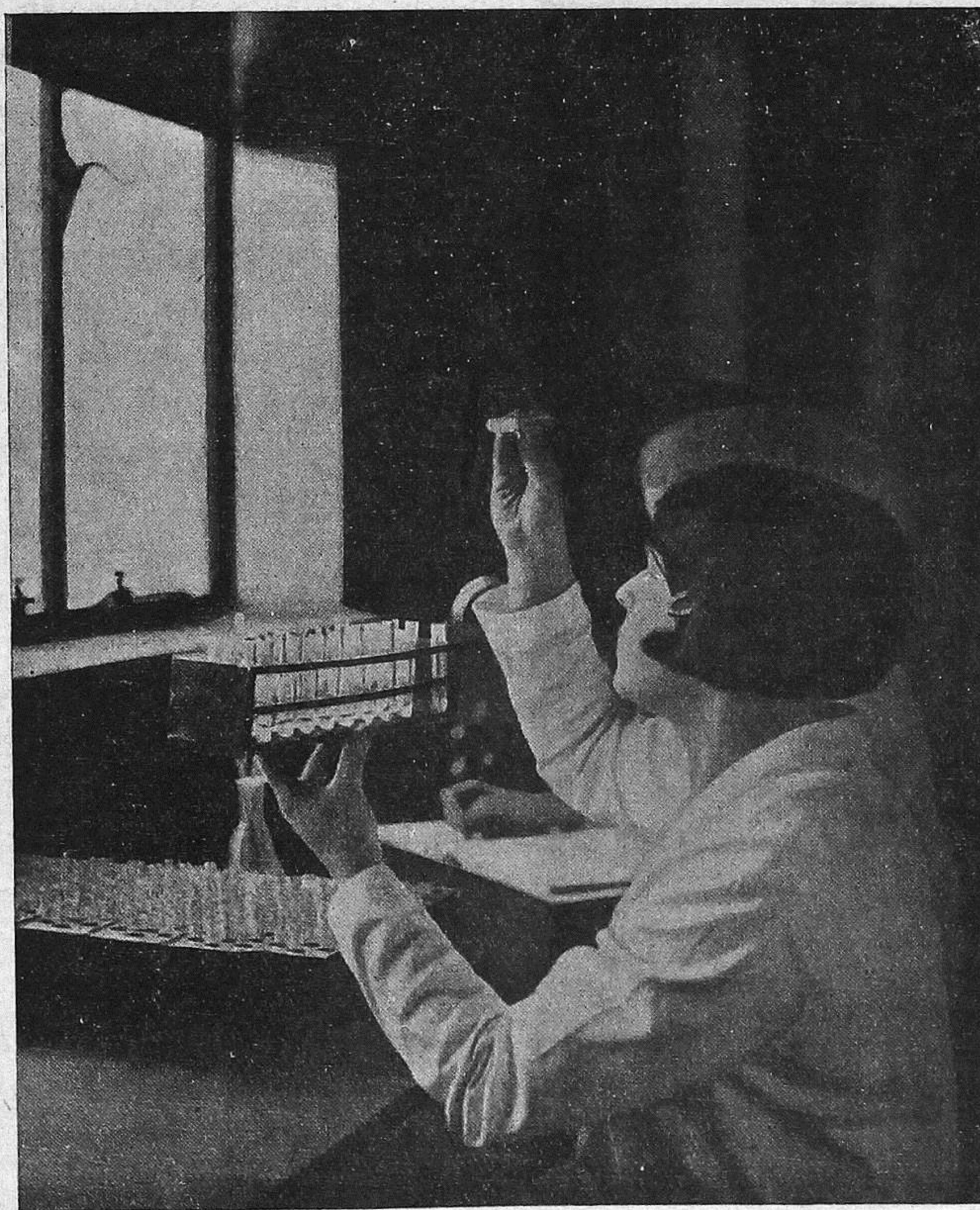



Fig. 2 — Notare come lo sguardo sia diretto, tangenzialmente alla luce, sopra uno schermo nero appositamente disposto innanzi alla finestra.

(da *R. L. Kahn*, Op. cit.)

Dopo aver stabilito il titolo di un antigene, occorre eseguire una serie di prove con un buon numero di sieri, sia di luetici che di per-

sone indenni, le quali vanno condotte parallelamente anche con un antigene *standard.* Tre casi possono darsi: o l' antigene in prova risulta della stessa sensibilità dell' antigene campione, o risulta meno sensibile di esso, o più sensibile. Nel primo caso, naturalmente, non occorre procedere ad altro: l'antigene in esame può essere considerato e usato come *standard* anch'esso. (Questa evenienza non si avvera quasi mai se il titolo dell'antigene in prova si discosta notevolmente da 1,1). Negli altri due casi occorre procedere alla correzione dell'antigene.

Esaminiamo singolarmente le opposte possibilità. Immaginiamo dapprima un antigene più sensibile del campione: quasi sempre si tratta di un antigene più ricco di lipidi e quindi a titolo più alto dello *standard;* il metodo preferibile per la correzione, tra i due opposti che si possono in ogni caso sperimentare, è, naturalmente, la diluizione mediante alcool colesterolato al 0,6 °/₀. Si prova a diluire in misura varia (5 °/₀; 10 °/₀; 15 °/₀; 20 °/₀; 25 °/₀) alcune porzioni dell'antigene da correggere e si determina, nei modi già detti, prima il titolo e poi la sensibilità specifica di ciascuna di queste porzioni. Se fra esse ve n' è una che corrisponde ai requisiti del campione si diluisce secondo analoga proporzione tutto quel che resta dell' antigene da correggere, il quale risulterà così definitivamente corretto; se con qualcuna delle diluizioni si è ottenuto solamente un'approssimazione allo *standard,* si procede ad altre prove con altre diluizioni, che saranno suggerite dai risultati stessi. La diluizione del 25 °/₀ rappresenta un massimo, da non superare, poichè si è visto che gli antigeni i quali non si sono corretti malgrado una diluizione così elevata migliorano assai più facilmente quando si trattino nel modo opposto, cioè con l'aumento dei lipidi. In questi casi, si aggiungono dosi crescenti di lipidi, risultanti dall'evaporazione di dosi crescenti dell' estratto alcoolico non colesterolato della stessa polvere di cuore, appositamente tenuto in serbo. (Anche qui si fanno aggiunte del 5 °/₀; del 10 °/₀ del 15 °/₀; del 20 °/₀; del 25 °/₀, misurando le rispettive dosi dell'estratto non colesterolato e servendosi del residuo; anche qui si praticano i soliti controlli del titolo e della sensibilità specifica).

Immaginiamo ora un antigene meno sensibile del campione. Anche in questo caso bisogna regolarsi in base al titolo: se questo è superiore al campione si preferisce diluire; nel caso opposto si aggiunge « reattivo sensibilizzante » e alcool colesterolato (quest'ultimo in proporzione di circa 10-20 °/₀).

KAHN ha proposto una reazione diagnostica qualitativa (che è quella

comune) e una reazione quantitativa. Le modalità di queste reazioni variano alquanto a seconda che siano eseguite con il siero di sangue, con il liquido cefalo-rachidiano o con altri liquidi organici e a seconda che si usi antigene « campione » o « sensibilizzato ».

Dopó quanto è stato già detto, basteranno brevi cenni per descrivere la tecnica di queste reazioni. Cominciamo dalla reazione qualitativa con il siero di sangue. Si diluisce l'antigene con la quantità necessaria (*titolo*) di soluzione fisiologica. Si lascia a sè stessa la miscela durante almeno 10' (ma non più di 20'), per farla « maturare ». Si trasportano, con pipetta graduata al millesimo di cc., tre porzioni di questa sospensione di antigene in altrettante provette e propriamente cc. 0,05 nella prima; cc. 0,025 nella seconda e cc. 0,0125 nella terza. Subito dopo si aggiungono di colpo in ogni provetta cc. 0,15 di siero che sia stato riscaldato a 56° C. poco prima della prova. Si scuotono i tubi per 3'. Si aggiunge 1 cc. di soluzione clorosodica nella prima provetta (cioè quella che contiene cc. 0,05 della sospensione di antigene) e cc. 0,5 nelle altre due provette. Si leggono i risultati. KAHN adotta uno schema che si trova riassunto nelle tabelle seguenti.

TABELLA II

Notazioni schematiche secondo KAHN	Fenomeni corrispondenti (aspetto del liquido)
+ + + +	precipitato assai ben visibile, sospeso in liquido del tutto trasparente
+ + +	precipitato abbastanza evidente, in liquido limpido
+ +	precipitato fine, in liquido alquando torbido
+	precipitato assai fine, in liquido torbido
±	precipitato malamente percettibile, in liquido torbido
—	assenza di qualunque precipitato o intorbidamento, in liquido opalino limpido

TABELLA III

Reazioni	Tubo I (antigene 0,05)	Tubo II (antigene 0,025)	Tubo III (antigene 0,0125)	Interpretazione complessiva dei risultati
1	++++	++++	++++	++++
2	+++	++++	++++	
3	++	++++	++++	+++
4	+	++++	++++	
5	—	++++	++++	
6	+	+++	++++	
7	—	+++	++++	++
8	—	+++	+++	
9	+	++	+++	
10	—	++	++++	
11	—	+	++++	
12	—	±	++++	+
13	—	—	++++	
14	—	+	+++	
15	—	—	+++	
16	—	+	++	
17	—	±	++	±
18	—	+	++	
19	—	±	+	—
20	—	—	+	
21	—	—	—	

L'autore usa fare la media aritmetica dei segni + nei tre tubi, trascurando le frazioni eguali o inferiori a un terzo e calcolando come — (cioè trascurando anche) i segni ±.

Alcune avvertenze sono necessarie. La più importante riguarda il

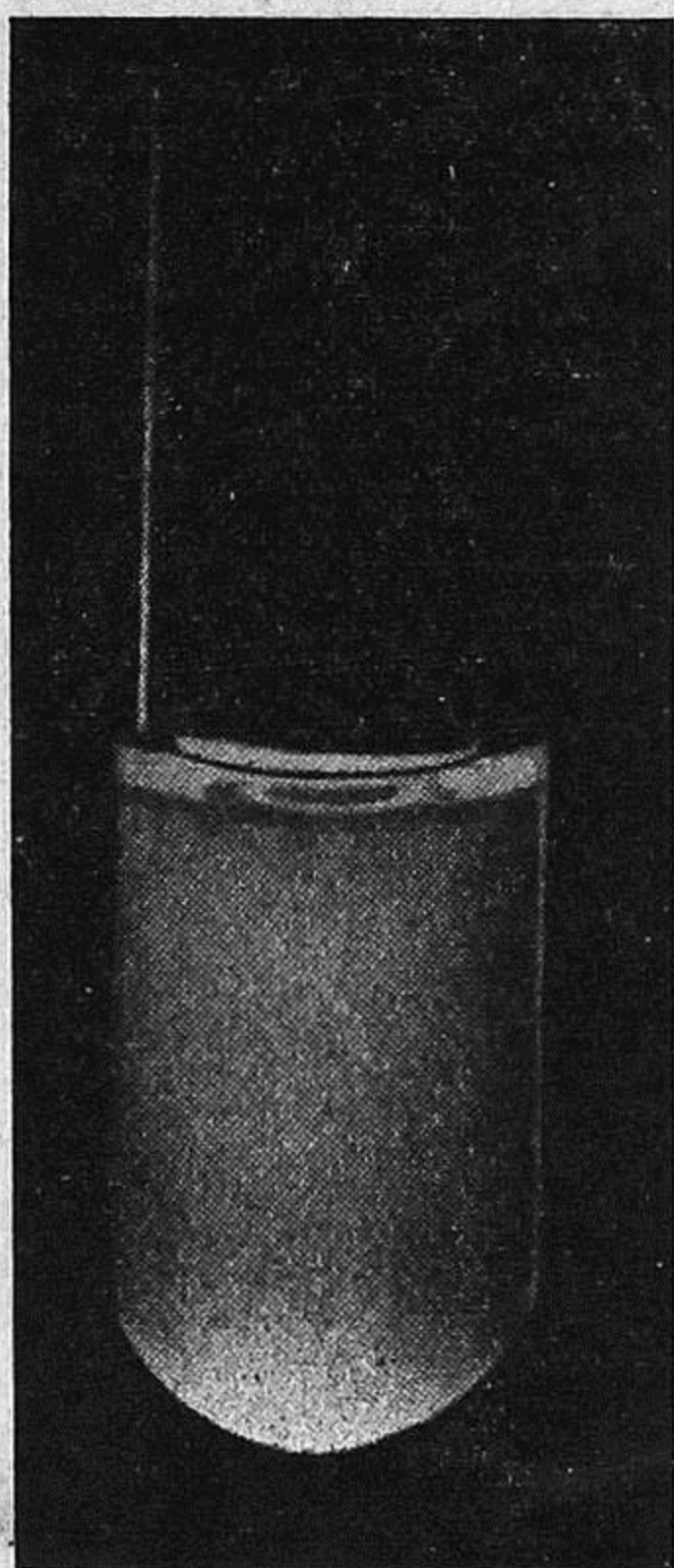
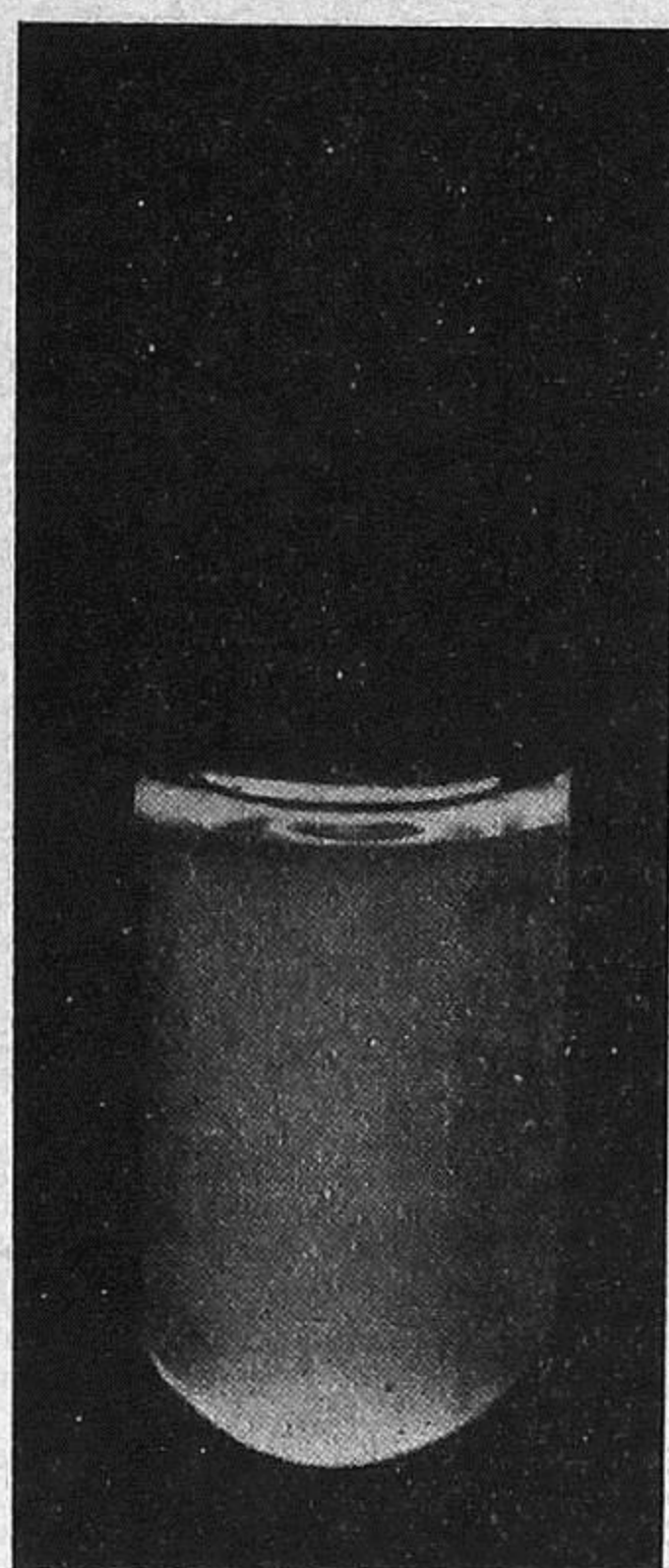
modo di preparare la sospensione di antigene, la quale deve risultare da una mescolanza *rapida* e *completa* della soluzione salina con l'antigene alcoolico, in proporzione *esattissima*. È chiaro che quest' ultimo requisito non è raggiungibile in pratica se si vogliono usare quantità

Reazione positiva — Reazione negativa

Fig. 3. — Aspetto dei tubi, osservati su fondo scuro a debole ingrandimento. (da *R. L. Kahn*, Op. cit.)

assai piccole di liquidi o recipienti sproporzionati. KAHN consiglia di non impiegare mai meno di 1 cc. di antigene e veramente questo è da considerare un limite assai ristretto, da non sorpassare per nessuna ragione. Per ciò che riguarda la rapidità della mescolanza fra soluzione salina e antigene, che pure è una condizione essenziale di successo, KAHN raccomanda di adoperare recipienti di forma e grandezza speciale (tubi di vetro a fondo piano, dal diametro interno di cm. 1,5 e alti cm. 5,5) e di procedere in modo sempre eguale, versando assai rapidamente dapprima la soluzione clorosodica nell'antigene e poi versando sei volte di seguito, senza intervallo, da un tubo all'altro la miscela. Per assicurare la massima uniformità di risultati può essere utile attenersi fedelmente a queste prescrizioni dell' autore, ma è chiaro che uno sperimentatore accorto può raggiungere anche con altri mezzi risultati analoghi.

Altra avvertenza è questa: quando la temperatura ambiente è inferiore ai 21°-24° C. è bene porre per 10'-15' in termostato (a 37° C.) i tubi in cui si sono messi i reagenti per la prova, prima di agitarli: in tal modo si rende ben visibile il precipitato che si forma se la reazione è positiva.

In quanto al modo di illuminare e disporre i tubi per la lettura dei risultati se n' è già discusso. Non appare necessario far uso delle lampade create appositamente (Fig. 4).

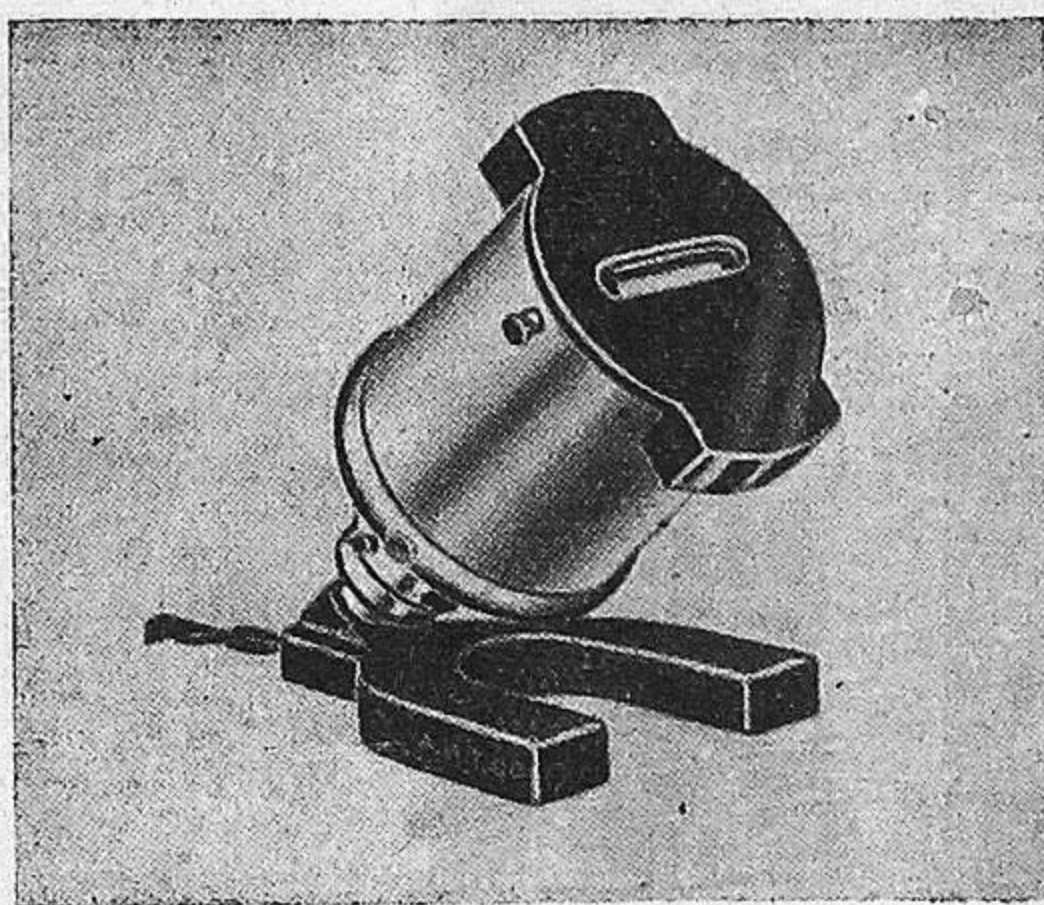



Fig. 4. — Tipo di lampada speciale usata per la lettura delle reazioni. (I tubi si pongono inclinati innanzi alla fessura luminosa del diaframma, guardandone il contenuto sul fondo nero del diaframma stesso). (da *R. L. Kahn*, Op. cit.)

È utile allestire dei controlli con sieri di luetici, di individui indenni e con semplice soluzione clorosodica, ogni volta che si eseguono le reazioni diagnostiche, specie se con antigeni nuovi.

La lettura delle reazioni fortemente positive si compie meglio nel primo tubo (quello con la maggiore quantità di antigene); la lettura delle reazioni debolmente positive si fa meglio (o soltanto) negli ultimi tubi. Questo almeno è quanto si osserva nella grande maggioranza dei casi, ma talvolta, per ragioni che sfuggono, si nota un comportamento inverso: sono le così dette reazioni atipiche, a proposito delle quali KAHN ha osservato che se le prove si ripetono dopo aver diluito al doppio o al triplo i sieri con soluzione fisiologica ovvero prelevando dopo qualche giorno nuovamente il sangue agli stessi infermi si ottengono quasi sempre risultati tipici.

In seguito alle decisioni prese durante l'ultima Conferenza internazionale tenuta a Copenaghen sotto il patronato della Società delle Na-

zioni, KAHN propone di adottare la seguente norma per la indicazione dei risultati sierologici.

TABELLA IV

Risultati complessivi espressi secondo il sistema KAHN	Risultati complessivi espressi secondo il sistema stabilito a Copenaghen
+ + + + + + + + +	Reazioni positive (+)
+ ±	Reazioni dubbie (±)
—	Reazioni negative (—)

Come si è detto, la reazione di KAHN può essere eseguita oltre che con metodo qualitativo anche con metodo quantitativo. A tal uopo HOPKINS & ROCKSTRAW hanno elaborato una tecnica basata sull'impiego di dosi scalari di antigene e dose fissa di siero (cc. 0,15), comprendendo fra le dosi di antigene anche le tre solitamente adoperate nella reazione qualitativa. Questo metodo ha l'inconveniente di richiedere quantità abbastanza notevoli di siero, quali spesso non si hanno a disposizione nella pratica. Per tale motivo, KAHN ha preferito adottare un metodo basato sul principio inverso (dosi scalari di siero e dose fissa di antigene).

Il metodo quantitativo di KAHN consiste nell'allestire la reazione impiegando cc. 0,01 della sospensione di antigene (dose prescelta in seguito a numerose prove) e cc. 0,15 di siero diluito prima dell' uso con soluzione fisiologica nei rapporti di 1:5; 1:10; 1:20; 1:30; 1:40; 1:50; 1:60. Oltre a queste prove se ne allestisce una con siero non diluito.

Stabilita come unità di misura convenzionale del grado di positività dei sieri luetici la così detta *unità Kahn* e partendo dal presup-

posto che almeno quattro di tali unità corrispondano a una reazione positiva (almeno ++) ottenuta con siero non diluito, usato nel rapporto di 15 : 1 rispetto all'antigene campione, è facile stabilire il grado di positività di un siero cimentato col metodo quantitativo di KAHN : basta moltiplicare per 4 il numero che esprime la massima diluizione alla quale il siero stesso si è mostrato capace di fornire reazione positiva. (Per esempio: siero positivo fino alla diluizione di 1 : 50 = unità KAHN 4 × 50, cioè 200 unità).

La prova quantitativa si esegue come la qualitativa. Dopo lo scuotimento, si aggiunge cc. 0,5 di soluzione clorosodica in ciascun tubo.

È infrequente trovare sieri che diano reazioni positive in diluizioni superiori a 1 : 60; molto raro trovare sieri positivi al di là di 1 : 100.

KAHN consiglia di usare la prova quantitativa, oltre che per seguire l'effetto del trattamento terapeutico nei luetici, anche per misurare la sensibilità degli antigeni di nuova preparazione rispetto a un antigene campione; inoltre consiglia agli studiosi di sperimentare su vasta scala il metodo quantitativo con antigene sensibilizzato.

Abbiamo già detto in che consista e come si ottenga un antigene sensibilizzato. Aggiungiamo che anche gli antigeni di questa categoria vanno sottoposti nel solito modo a prove di controllo, mediante sieri di luetici più o meno intensamente curati (che forniscano risultati assai deboli, dubbi o negativi con antigene campione), allestendo prove parallele con un antigene sensibilizzato di attività ben nota.

Il titolo degli antigeni sensibilizzati è notevolmente più elevato di quello degli antigeni *standard*: esso si aggira per lo più intorno a 2. Per la prova qualitativa KAHN consiglia ora di usare questi antigeni all'unica dose di cc. 0,025, poichè ha notato che è quella che fornisce i risultati migliori con la dose di cc. 0,15 di siero. Dopo lo scuotimento si aggiunge soluzione salina, alla dose di cc. 0,5.

Il liquido cefalo-rachidiano fornisce nella maggior parte dei casi reazioni troppo deboli quando venga usato come il siero di sangue. KAHN è riuscito ad ottenere risultati assai sodisfacenti, precipitando con solfato di ammonio le globuline (alle quali, come si è detto, è legata la sostanza o il gruppo di sostanze cui si deve la positività delle reazioni nei luetici) e usando per le sue prove una soluzione concentrata di tali globuline del *liquor*. Gli antigeni vanno titolati appositamente in presenza di una piccola quantità di solfato di ammonio, poichè si è constatato che un po' di questo sale resta aderente al precipitato globulinico e può diminuire leggermente la dispersibilità degli ag-

gregati lipidici delle sospensioni di antigene. L'autore usa, perciò, per questa tolazione, una soluzione clorosodica che contiene il 3 °/₀ di $MgSO_4$.

Ecco in breve il modo di procedere. Si versano, in un tubo da centrifuga, cc. 1,5 di liquido cefalo-rachidiano e cc. 1,5 di una soluzione satura di solfato di ammonio *purissimo*, la quale sia stata preparata e accuratamente filtrata a caldo; si mescola bene; si tiene a bagno-maria a 56°C. per 15'; si centrifuga per 10'; si decanta il più completamente possibile il liquido limpido che sovrasta il precipitato globulinico, servendosi di un capillare ad estremità curva assai affilata; si versano cc. 0,15 di soluzione clorosodica al 0,9 °/₀ (priva di solfato di ammonio); si scioglie, mescolando *dolcemente*, il precipitato; si usa la soluzione così ottenuta, addizionandola alla sospensione di antigene nel rapporto di 15 : 1 e procedendo in tutto nel solito modo.

Assai raramente si nota che la centrifugazione non permette di separare bene il precipitato globulinico, il quale resta sospeso nella soluzione di solfato di ammonio, rendendola torbida. In questi casi KAHN consiglia di aggiungere una piccolissima quantità di talco in polvere e centrifugare ancora: il talco adsorbe il precipitato globulinico e lo trascina in fondo al tubo; ciò fatto, si decanta il liquido limpido, si aggiunge la soluzione clorosodica e si agita in seno ad essa il precipitato, il quale in parte è costituito dalle globuline, che si disciolgono facilmente, e in parte da talco, che resta sospeso; si centrifuga un'altra volta e si decanta la soluzione limpida, lasciando sul fondo del tubo il talco.

La reazione di KAHN è stata anche applicata con buon successo allo studio dell'essudato raccolto dalle ulcere luetiche (diluito, all'occorrenza, con poca soluzione fisiologica e mescolato alla sospensione di antigene nel rapporto di 10 : 1), nonchè allo studio di essudati, trasudati e liquidi biologici di varia natura, ma con risultati mediocri.

Si possono anche praticare reazioni in goccia pendente (da osservare al microscopio con illuminazione in campo chiaro e in campo oscuro) o microreazioni con quantità proporzionalmente ridotte dei vari reagenti (da misurare, all'occorrenza, servendosi di sottilissimi capillari all'uopo tarati o di anse metalliche); ma è chiaro che in simili casi si rinunzia fatalmente, almeno in parte, alla precisione delle misure e, quindi, alla fedeltà dei risultati.

Nel complesso, la reazione di KAHN offre un larghissimo campo di utilizzazione pratica ed anche un vasto campo di studi, che si presenta ricco di interesse e promettente di nuove conquiste sulla via del perfezionamento dei metodi sierodiagnostici.

BIBLIOGRAFIA

Non è possibile riportare l'indicazione di tutto quanto è stato scritto fino ad oggi sulla reazione di KAHN, *poichè si tratta di una mole immensa di pubblicazioni. Riportiamo per ciò solamente i titoli dei lavori comparsi nel 1929, rimandando per la bibliografia precedente alle indicazioni che si trovano nelle due opere fondamentali :*

KAHN, R. L. — *Serum diagnosis of syphilis by precipitation,* 1925, Baltimore. — WILLIAMS e WILKINS, Edit.
— *The Kahn Test,* 1928. Baltimore. — WILLIAMS e WILKINS, Edit.

e nella maggior parte dei lavori qui appresso elencati :

BESANCON, J. H. e MAYER, V. R. — *J. Lab. e Clin. Med.* **15**, 25–29 [1929].
BRONSTEIN, V. G. e SKLIAR, O. P. — *Venereol. i dermat.* **6**, 167–172 [1929].
CAFFEY, J. e KREIDEL, K. V. — *Am. J. Dis. Child.* **38**, 1206–1221 [1929].
CASTENS, E. — *Deutsche med. Wchnschr.* **55**, 1461–1464 [1929].
CRAIG, C. F. — *Am. J. Syph.* **13**, 206–215 [1929].
DAVENPORT, K. M. — *Am. J. Syph.* **13**, 570–574 [1929].
— *Am. J. Syph.* **13**, 575–582 [1929].
DEMANCHE, R. — *Presse méd.* **37**, 356–358 [1929].
— *Rev. franç de dermat. et de vénéréol.* **5**, 72–83 [1929].
— e GUÉNOT, L. — *Bull. Soc. franç. de dermat. et syph.* **36**, 405–411 [1929].
EATON, P. e DAMREN, F. L. — *J. M. A. Georgia* **18**, 325 [1929].
FIGUEIRA, L. e TRINCAO, C. — *Compt. rend. Soc. de biol.* **100**, 423–425 [1929].
FINKELSTEIN, U. A.; ARISTOFF, V. G. e KATZIN. R. I. — *Venereol i dermat* **6**, 67-76
GALGÒCZY, J. KOVÀCS, J. e OLÀH, G. — *Orvosi hetil.* **73**, 525–526 [1929].
GREEN, F. — *Canad. M. A. J.* **20**, 26–29 [1929].
GREVAL, S. D. S. — *Indian J. M. Research* **16**, 1009-1018 [1929].
HECHT, H. e HABER, H. — *Med. Klin.* **25**, 1434–1435 [1929].
HINTON, W. A. e BERK, A. – *New England J. Med.* **201**, 667–670 [1929].
KAHN, R. L.; LUBIN, G. e MC DERMOTT, E. — *J. Lab. e Clin. Med.* **14**, 876-885 [1929].
— *J. Lab. e Clin. Med.* **14**, 979-994 [1929].
KAHN. R. L. e MC DERMOTT, E. — *Am. J. Syph.* **13**, 557–569 [1929].
LAI, D. G. e S. W. — *China M. J* **43**, 22-27 [1929].
LUBIN, G.; KAHN, R. L. e KURTZ, M. B. — *J. Infect. Dis.* **45**, 196-207 [1929].
MC DERMOTT, E. B. — *Arch. Dermat. e Syph.* **20**, 860-861 [1929].
— *Arch. Path.* **8**, 661-663 [1929].
MC. INTYRE, M. C. e GILMAN R. L. — *J. A. M. A.* **93**, 358–360 [1929].
MARSH, F. — *Brit. M. J.* **2**, 666-667 [1929].
MASUDA, R. — *Jap. J. Dermat e Urol.* **29**, 9 [1929].
NAGLE, N. — *J. Missouri M. A.* **26**, 15-18 [1929].
— e MONELL, M. — *J. Lab. e Clin. Med.* **15**, 62–65 [1929]

NISHIO, M. — *J. Infect. Dis.* **45**, 148-155 [1929].
PROESCHER, F. e DAMREN, F. L. — *J. M. A. Georgia*, **18**, 325 [929].
SALAMON, E. *Compt. rend. Soc. de biol.* **101**, 286-289 [1929].
THJOTTA, T. e SCHYTTE BLIX, A. — *Acta derm.-venereol.* **9**, 310-317 [1928].
— *Am. J. Syph.* **13**, 283-292 [1929].
TÖPFER, D. — *Zentralbl. f. Bakteriol.* (Abt. I) **112**, 231 [1929].
TRINCAO, C. — *Compt. rend. Soc. de biol.* **102**, 226 [1929].